— *Separatabdruck.* —

Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und für mikroskopische Technik

Band XI, 1894, p. 172—207.

[Laboratorio di Patologia Generale del R. Istituto Superiore in Firenze, diretto dal Prof. A. Lustig.]

Ricerche sulla colorabilità delle cellule viventi.

Del

Dr. Gino Galeotti,

assistente.

Avendo intrapreso una serie di ricerche sulla costituzione del citoplasma, mi occorse di fare alcune esperienze sulle colorazioni di cellule viventi o appena morte, e i resultati che ottenni mi spinsero a studiare più ampiamente i fenomeni delle colorazioni vitali.

Tali esperienze ebbero per me differenti scopi. In primo luogo quello di osservare il modo di comportarsi delle cellule viventi in presenza di sostanze estranee; poi quello di ricercare il significato biologico dei diversi elementi cellulari i quali reagiscono differentemente di fronte a tali sostanze, e nello stesso tempo di mettere in evidenza alcune particolarità citologiche, con la sicurezza che queste non fossero quadri artificiali, come può spesso avvenire nelle lunghe manipolazioni della tecnica microscopica. Nel frattempo ho potuto determinare le condizioni, le quali è necessario che si verifichino perchè possano ottenersi colorazioni più o meno estese degli elementi anatomici sugli animali viventi.

Poichè un tale argomento ha interessato molto e fisiologhi ed istologhi, così ho trovato nella letteratura una quantità di lavori che credo di dover riassumere piuttosto ampiamente.

L'aver visto colorato in rosso il tessuto osseo di alcuni animali che avevano mangiato la robbia suggerì a Duhamel nel 1739 l'idea di una colorazione sperimentale delle ossa per lo studio di questo tessuto; e poi i tentativi di fissazione di colori sulle ossa con le iniezioni di curcuma, di ematossilina e di altre sostanze coloranti vegetali furono con maggiore o minore successo ripetuti assai più tardi da altri ricercatori e specialmente da Heckel (1) e da Lieberkühn (2); ma queste esperienze

non hanno più un interesse particolare che ne permetta una speciale trattazione.

Le iniezioni di varie altre sostanze coloranti furono poi praticate nel sangue di differenti animali, con lo scopo di seguirne la eliminazione dall'organismo e di scoprirne così il meccanismo della escrezione. Gli autori che si sono occupati di ciò hanno ottenuto resultati interessanti tanto per riguardo allo scopo fisiologico che si erano proposti, quanto per la conoscenza della struttura degli organi ghiandolari.

Heidenhain (3) iniettò nel 1875 nelle vene di diversi animali a sangue caldo soluzioni d'indigosolfato di sodio, ed all'esame microscopico dei reni sfibrati a fresco, o fissati con un suo metodo speciale, trovò che i glomeruli restavano del tutto incolori, e dei canalicoli contorti alcuni mostravano colorati i bastoncelli descritti da questo autore negli epiteli, e, nelle iniezioni di grandi dosi, pure alcuni nuclei. Egli dice che anche nelle cellule scolorate esiste la sostanza iniettata, ma allo stato incoloro di leucoindosolfato e ciò per il forte potere riducente che hanno il glomerulo e i canalicoli del laberinto.

Chrzonszczewsky (4) adoperò pure l'indosolfato di sodio e la fuxina per lo studio della funzionalità epatica e renale, iniettando questi colori nello stomaco di diversi animali: trovò così colorato il contenuto dei canalicoli biliari e uriniferi e alcune cellule epatiche, però qualche tempo dopo la morte dell'animale. Con l'indocarminio vide precipitati granulari nei canalicoli contorti e una leggera colorazione degli epiteli dopo che erano stati esposti per qualche tempo all'aria.

Wittich (5) ripetendo gli stessi esperimenti, iniettando però carminio ammoniacale, potè osservare il coloramento dei glomeruli, e anche quello parziale degli epiteli del labirinto, quando aveva procurato disturbi di innervazione e di circolazione nel rene stesso.

Anche Schindler (6) e Solger (7) iniettarono negli animali inferiori carminio d'indaco con lo scopo di studiarne le modalità d'escrezione.

Più recentemente l'Ehrlich (8) dimostrò con analoghi mezzi il potere riducente di certe parti del fegato e dei reni, trovando che le cellule di questi organi, pur serbandosi incolore, possono, dopo l'iniezione di sostanze coloranti riducibili (bleu d'alizarina, bleu d'indofenolo), dare una secrezione colorata.

Kowalewsky (9) iniettò con lo stesso scopo vari colori vegetali (carminio, indosolfato di soda, bleu d'alizarina) in diversi crostacei e insetti, e vide che le cellule degli organi destinati alla escrezione si ricoprivano di granuli colorati.

Questi sperimentatori si occuparono dunque della fisiologia della secrezione e la osservazione citologica non fu che un mezzo per tale studio.

Altri invece cercarono di produrre nell'animale vivente colorazioni atte a mettere in maggiore evidenza certe particolarità morfologiche, pensando che, senza l'uso dei reagenti usati in microscopia, si evitassero tutte quelle trasformazioni che ci fanno comparire gli elementi anatomici con un aspetto più artificiale che reale.

E con tale scopo le colorazioni praticate negli animali viventi sono in questi ultimi anni molto progredite, e le idee teoriche che sono state emesse dai vari sperimentatori sopra così importanti fenomeni, e le interpretazioni che ne sono state date variano assai.

Prima degli altri io passerò in rivista i lavori che sono stati fatti sulla fine anatomia del sistema nervoso con le iniezioni di bleu di metilene, perchè questi lavori che sono i più importanti, debbono essere riuniti in un gruppo a parte onde poterli confrontare fra loro.

Come è noto, l'Ehrlich (10 e 11) nel 1886 scoprì il modo di colorare i nervi negli animali viventi con le iniezioni nel sangue di bleu di metilene rettificato (privo di zinco) sciolto in soluzione di ClNa. Vide così colorati non solo i cilindrassi delle fibre, ma anche le più sottili ramificazioni nervose e le terminazioni nei vari organi, e i reticoli fibrillari nel sistema centrale; vide pure che al contrario tutti gli altri elementi restavano incolori: perciò formulò la teoria che si producesse fra il bleu di metilene e la sostanza nervosa una reazione chimica per la quale il colore fosse là fissato, e che questa reazione potesse avvenire soltanto durante la vita, anzi solo durante la più alta funzionalità dei nervi. Cosifatto metodo che facilitò lo studio della morfologia sottile degli elementi nervosi, e che anche adesso dà tanto buoni resultati, fece pensare all'Ehrlich che esso potesse essere il caposaldo d'una serie di ricerche destinate a far luce anche sul chimismo biologico di certi elementi.

Poi l'Aronson (12) ammise pure che la colorazione dei nervi avvenisse soltanto quando essi si trovassero in presenza di bleu di metilene durante la vita dell'animale; perchè solo in questo momento, essendo ricchi di ossigeno, non avevano potere riducente sopra il colore; potere che invece acquistavano appena, con la morte dell'animale, veniva loro a mancare l'ossigeno. Il bleu di metilene invece assunto dai nervi dopo la morte, veniva trasformato in un leucoderivato, che però poteva di nuovo talvolta ritornare azzurro mediante l'esposizione all'aria del preparato, mediante un processo di secondaria ossidazione.

L'Arnstein (13 e 14), dopo aver trovato il modo di rendere duraturi i preparati, trattandoli con una soluzione di ioduro di potassio, pose in campo la questione se realmente fosse necessaria la vitalità dei nervi affinchè la colorazione avvenisse, ed osservò che questa si produceva anche con le iniezioni nell'animale di recente ucciso; anche, sebbene in modo più imperfetto, in pezzetti staccati e immersi nella soluzione di bleu di metilene. Osservò pure che nelle iniezioni di non piccole quantità di bleu di metilene, quali son necessarie perchè la colorazione avvenga in animali a sangue caldo, questi muoiono quasi subito dopo, certamente molto prima che possa il colore iniettato venire a contatto con i filamenti nervosi; e che perciò le belle colorazioni avvenute in tali casi son dovute a fenomeni post-mortali.

Anche lo Smirnow (14, 15) fece simili esperienze e trovò il modo di fissare il bleu di metilene con il picrato ammonico e con il picrocarminio; e accennò pure al fatto che i preparati vengono meglio e si conservano più a lungo se prima della fissazione sono esposti all'aria.

S. Mayer (16) dimostrò egualmente che i nervi si colorano col bleu di metilene anche dopo morti, non tanto bene però quanto quelli che durante la vita si trovarono in presenza di questa sostanza colorante. Se poi la morte è avvenuta da molto tempo, allora è difficile assai ottenere la colorazione.

Il Dogiel (17, 18, 19, 20) decise poi la questione, provando che la colorazione dei nervi avviene dopo la morte, con le seguenti esperienze. Ottenne in primo luogo, come l'Arnstein (l. c.) la colorazione con l'iniezioni in animali uccisi poco tempo prima mediante cloroformio; osservò che detta colorazione non avviene mai se non si espone all'aria per qualche minuto il pezzo in esperimento; e in terzo luogo ottenne la colorazione degli elementi nervosi, in pezzetti di retina escisi di recente, sul portaoggetti, usando soluzioni diluite di bleu di metilene; e potè seguire il processo sotto il microscopio. Da ciò concluse: Aller Wahrscheinlichkeit nach werden wir durch die Bestimmung, wie lange nach dem Tode des Thieres die Nervenelemente in den verschiedenen Geweben das Vermögen, durch Methylenblau tingirt zu werden, bewahren, die Möglichkeit erhalten, zugleich genau die Zeit zu bestimmen, wann erstere ihre Lebensthätigkeit verlieren — absterben.

Anche Riese (21) trovò necessaria la esposizione all'aria perchè avvenisse il fenomeno. Feist (22) si persuase avvenire queste colorazioni in causa delle alterazioni fisiche e chimiche che la morte produce nel nervo; osservò anche che non tutte le fibre di un nervo si colorano, e che il numero delle fibre colorate è in proporzione inversa alla viva-

cità dei movimenti dell'animale. Nell'animale del tutto paralizzato si colorano invece quasi tutte le fibre. Nel nervo la colorazione procede dalla periferia al centro cominciando dal perinervio che si tinge intensamente; là mielina resta del tutto scolorata e i cilindrassi si colorano in maggiore o minor numero. Ammette anche che i nervi in uno stato agonico assumano il bleu di metile riducendolo e che perciò non appaiano colorati se non in seguito ad una consecutiva ossidazione, la quale può avvenire soltanto dopo la morte e la esposizione all'aria del tessuto nervoso.

Infine citerò altri che hanno usato il metodo delle colorazioni vitali per lo studio della morfologia del sistema nervoso, come Prus (23) che ricercò le sottili ramificazioni della guaina dei grossi nervi (nervi nervorum periphericorum) Cuccati (24) che studiò le terminazioni nervose nei muscoli addominali della rana, Joseph (25) il sistema nervoso negli eteropodi, Retius (26) i corpuscoli nervosi nei genitali di coniglio, Ciaccio (27) le placche nervose terminali dei tendini, Zoja (28) il sistema nervoso nell'Hydra.

Apáthy (29) finalmente ha su questo proposito alcune considerazioni speciali. — Egli distingue due specie di reazioni che avvengono nel sistema nervoso col bleu di metilene. La prima, la migliore, si produce solo sotto condizioni specialmente favorevoli ed è una tinzione *sensu strictissimo*, e per essa si colorano le fibrille elementari in bleu scuro, le parti protoplasmatiche delle fibre e il corpo delle cellule ganglionari in rosso violetto; la sostanza interfibrillare e perifibrillare e i nuclei restano scolorati. Nella seconda reazione le fibrille non son colorate; nelle parti interfibrillari e protoplasmatiche vi è un precipitato granulare bleu e i nuclei son pure assai colorati. La prima va considerata come una reazione specifica della sostanza conducente; poichè, come nelle reazioni specifiche fra una sostanza ed un colore, un decolorante mostra la sua azione su tutto il tessuto meno che nelle parti che hanno quella reazione specifica, così anche in questo caso l'ammoniaca fa scolorire tutte le altre parti, meno le fibrille nervose. Ma si deve realmente considerare questa reazione come vitale, vale a dire si deve credere che la prima reazione possa solo avvenire durante la vita del nervo, oppure altre sono le condizioni per la sua produzione? Sperimentò questo autore allora sopra piccolissime Hirudinee, che sottopose al microscopio in una goccia di soluzione allungata di bleu di metilene, e vide in esse colorarsi molti granuli di varie cellule e ghiandole dellâ pelle, ma mai i filamenti nervosi; tagliando in due alcuni di questi animali ottenne ben colorato tutto il sistema nervoso. Per questa e per altre esperienze, l'Apáthy concluse che il nervo è normalmente impenetrabile

al colore e che la migliore colorazione, secondo il metodo dell'Ehrlich, avviene quando col dilaceramento o con altre lesioni si apre l'adito alla sostanza colorante.

Nè meno interessanti, nè meno numerosi sono stati i tentativi di colorazione di altri elementi cellulari durante la loro vita, o almeno appena avvenuta la loro morte, prima che le alterazioni chimiche post-mortali ne alterassero la configurazione morfologica.

Uno dei primi che, molto tempo addietro, cercasse di fare colorazioni vitali a questo scopo fu Gerlach (30), e concluse che i tessuti viventi non assumono mai il colore; solo quelli già morti e messi in soluzioni allungatissime di carminio tolsero da queste tutta la sostanza colorante, lasciando l'acqua incolora e tingendo il nucleo più intensamente che il corpo cellulare. Poi Pouchet e Legoff (31), iniettando soluzioni di carminio nel sacco linfatico della rana, osservarono certi leucociti carichi di granuli rossi, e dopo alcun tempo i tessuti connettivali acquistare una tinta rosea diffusa, e tingersi in rosso alcuni nuclei di cellule ghiandolari.

Certes (32-33) mise alcuni leucociti di rana in un liquido composto di piccolissime quantità di bleu di chinoleina o di cianina sciolta in siero, e vide che questi, dopo un certo tempo, si coloravano debolmente senza perdere del tutto i loro movimenti ameboidi. Negli infusori delle specie Chilodons e Opalina, trattati con lo stesso modo, riscontrò colorate le granulazioni grasse del citoplasma, perfettamente incolori il nucleo e il nucleolo: tali infusori subirono però durante queste esperienze una intossicazione più o meno grave. Tentò ripetere la colorazione negli epiteli vibratili delle rane, ma non vi riuscì.

Brandt (34) cercò di colorire Amebe e Flagellati con soluzioni allungatissime di bruno di Bismark e di ematossilina, e vide che il primo colore specialmente tinge in tali protozoi i granuli di grasso e certi altri granuli composti probabilmente di mucina e di cellulosio, lasciando inalterati nucleo e protoplasma; questi al contrario si colorano vivacemente dopo la morte.

Pfeffer (35) esperimentò le colorazioni vitali sulle piante, scegliendo i generi Spirogyra e Lemna e, provando su di esse vari colori rosanilici e azoici, trovò che alcuni di essi venivano immagazzinati nel succo cellulare, fissandosi in ispecie nelle primitive masse del succo o sotto forma di precipitato cristallino, o anche disciolti per il succo stesso. Alcuni pochi colori tingono pure certe parti del citoplasma, ma sempre in modo debole: molto bene si tingono nel citoplasma stesso alcuni vacuoli; in tutti i casi restano invece, durante la vita della cellula, incolori i nuclei e i cromatofori.

Flesch (36), trattando delle colorazioni microscopiche in genere, dice che nelle iniezioni di sostanze coloranti nell'animale vivente, queste sostanze si possono depositare come corpi stranieri negli interstizi cellulari o anche sotto forma di goccioline nel citoplasma, e che solo dopo la morte della cellula comincia un processo di diffusione, per il quale la sostanza colorante, da quei focolai, si diffonde negli interstizi molecolari del plasma.

Arnstein (11, 12) oltre i nervi osservò anche altri elementi negli animali sottoposti al metodo di Ehrlich, e vide che le varie cellule non assumono durante la vita una colorazione diffusa, ma che solo si tingono in esse alcuni granuli. Importanti sono le sue osservazioni sopra i muscoli nei quali riscontrò „in Reihen angeordnete blaue Körnchen, nur wenn fettige Degeneration an den Muskeln eingetreten ist, weil Fettpartikeln die Farbe annehmen".

Un quadro simile a quello sopra descritto vide lo Schultze (37) nei girini messi a vivere in una soluzione di bleu di metilene estremamente allungata, ma ad esso dette una spiegazione del tutto differente, ammettendo cioè che i granuli, i quali apparivano intensamente colorati negli epiteli intestinali o renali, e tra i dischi delle fibre striate, fossero i cosìdetti Bioblasti dell'Altmann. Rimise in campo così la teoria dell'Ehrlich della reazione vitale, affermando che questi granuli si colorano solo durante la vita e che la colorazione particolare di essi è dovuta appunto alla loro più spiccata potenzialità biologica. Questo autore compara tale elezione di granuli pel bleu di metile con la elezione che gli stessi hanno, secondo il metodo di Altmann, per la fuxina acida, e con ciò crede di rafforzare le teorie di quest'ultimo autore. Anche Mitrophanow (38) vide nelle iniezioni di bleu di metilene colorarsi molti granuli in differenti epiteli, ed ammise che questa colorazione fosse specifica per quelli elementi che posseggono un ricambio più rapido o che presentano fenomeni di accrescimento o rigenerazione. Le granulazioni cellulari che così si colorano, anderebbero considerate come elementi costituenti la cellula proprio nel senso di Altmann, e da essi dovrebbero ripetersi tutte le attività vitali della cellula.

Ma Martinotti (39) poco dopo dimostrò di nuovo che i tessuti viventi non si colorano, e che la morte di essi è necessaria perchè cominci la diffusione delle sostanze coloranti. Egli mise alcuni girini a vivere in acqua contenente carminio, e vide che non si coloravano affatto o soltanto in essi qualche epitelio in deperimento. Morendo si tingevano poi subito intensamente. Oltre che col carminio esperimentò con vari colori di anilina, la velenosità dei quali può impedire di com-

piere bene l'esperienza. I migliori resultati li ottenne col bleu di metile e con il bruno di Bismark, mediante i quali ottenne *intra vitam* colorati i granuli di cellule ghiandolari della pelle e dei muscoli.

Mosso (40) cercò di ottenere la colorazione dei leucociti e dei corpuscoli del pus mediante il verde di metile disciolto nella soluzione di ClNa, e osservò tingersi in essi certi granuli che egli considerò come il prodotto di un parziale processo necrobiotico; la colorazione diffusa cominciava invece con la intossicazione di queste cellule e la nuance assunta era differente a seconda della vitalità di esse. Sperimentando anche sugli epiteli a ciglia vibratili dei molluschi Anodenta ed Unio, si potè convincere che col verde di metile le cellule nella pienezza della loro vitalità non si colorano, e che poi, quando cominciano ad intossicarsi, assumono una tinta violetta: nell'agonia diventano bleu-verdi e finalmente dopo la morte appaiono decisamente verdi; e in questo momento anche il nucleo si colora. Queste variazioni di nuances dipendono dalle variazioni di reazione chimica che le cellule subiscono durante gli stadi premortali e dopo la morte. Anche Grandis (41) ebbe gli stessi resultati e riscontrò consimili variazioni di colore nei reni dell'Hydrophilus collocati durante la vita in presenza di una soluzione di verde di iodio. Dai reni stessi viene ridotto l'indosolfato di sodio che per essi viene escreto; le cellule renali per questo non appaiono in tal caso colorate, mentre il prodotto della secrezione esposto all'aria ben presto riacquista il colore caratteristico.

Talat (42) e Pilliet (43) ottennero pure colorazioni parziali nei nervi e nelle cellule epiteliali delle rane, mediante il bleu di metilene e la fuxina.

Kowalewsky (44) vide anche egli colorarsi parzialmente i leucociti immersi nella soluzione di bleu di metilene e crede che le parti scolorate appaiano tali, non perchè non abbiano assunto la sostanza colorante, ma perchè l'abbiano ridotta mediante la loro attività vitale. Anche Kühn (45) crede che sia necessaria una nuova ossidazione mediante la esposizione all'aria degli organi delle rane iniettate con bleu di metilene, affinchè si possa vedere in esse qualche colorazione.

Cuénot (46) ottenne colorazioni parziali degli epiteli renali e delle cellule a fermento nel fegato mediante iniezioni di fuxina e bleu di metilene nella cavità celomatica di vari crostacei. Apáthy (l. c.), studiando come sopra ho detto, la colorazione dei granuli nelle ghiandole delle Hirudinee per riguardo alla questione se essi rappresentino realmente i Bioblasti dell'Altmann, cosi si esprime: Oft entleerten sich die einzelligen Drüsen vor meinen Augen, und dann zerflossen die Alt-

MANN'schen „Bioblasten“ zu einem blaugefärbten Schleim, offenbar wollten sie mich davon überzeugen, wie sehr solche „Bioblasten“ das eigentlich Lebende in der Zelle sind.

Da questo riassunto bibliografico appare come la maggior parte degli sperimentatori abbia la convinzione essere sempre la tinzione di una cellula, o di un altro elemento anatomico, il segno della morte; e come soltanto pochi credano ad una vera *reazione vitale*, vale a dire ad una tinzione che soltanto si compia durante la vita e in elementi che hanno un'attivissima funzionalità.

Le mie ricerche sono state compiute sopra gli animali inferiori, perchè questi soltanto tollerano relativamente bene le iniezioni di sostanze coloranti. Ho in generale adoperato le salamandre (Salamandra maculata e Triton cristatus), e ho iniettato loro il colore nella cavità addominale con una siringa di PRAVATZ ad ago lungo, che infiggevo per la coda onde evitare che il liquido uscisse di nuovo dall'addome se ne ferivo direttamente le pareti. Poichè la cavità peritoneale ha pure un gran potere assorbente, raggiungevo con le iniezioni peritoneali, oltre lo scopo di vedere gli effetti del diretto contatto del liquido nei visceri addominali, anche quello di metterne una parte in circolazione e di vederne gli effetti mediante la introduzione negli organi per tale via.

Contemporaneamente ho osservato il modo di comportarsi delle cellule staccate nelle soluzioni coloranti in esame, e a tal proposito ho scelto gli epiteli vibratili delle vie aeree della rana, perchè con i movimenti delle ciglia mi davano un giusto criterio onde apprezzarne la vitalità.

Infine ho anche tentato le colorazioni *intra vitam* nei vegetali, scegliendo a tale scopo i fiori bianchissimi di Iris florentina, dei quali immergevo il gambo in soluzioni coloranti acquose. La colorazione, quando avveniva, era assai evidente e se ne potevano osservare facilmente certe modalità. Anche l'esame microscopico delle cellule di questi fiori mi ha dato qualche interessante resultato.

Tra i tanti colori di anilina messi in uso dalla tecnica microscopica, ne ho scelto vari che mi rappresentassero tutti i gruppi esistenti in tale numerosa famiglia, procurando di scegliere quelli che meglio si dissolvono nell'acqua, e che presentano un maggiore potere colorante. Feci di essi soluzioni titolate in acqua distillata che poi aggiungevo a soluzione di ClNa al momento delle esperienze, in proporzioni determinate e varie à seconda del potere colorante dei diversi composti.

I colori mi sono stati forniti dalla casa GRÜBLER di Lipsia, e perciò, per la esatta indicazione di essi, terrò conto del nome tedesco e

delle marche che lo accompagnano, e del nome chimico il quale indica, insieme alla costituzione chimica, i rapporti di parentela delle varie sostanze coloranti (cfr. nella Bibliografia Ni. 47, 48, 49).

I. Derivati della Rosanilina.

1. Fuxina.

Cloridrato di Pararosanilina e cloridrato di Rosanilina.

Considerata la poca solubilità della sostanza nell'acqua, se ne scioglie quanto è possibile nella soluzione di ClNa al 0·5 %.

a) Iniezione nel peritoneo di una grossa salamandra in quantità di 2 cc.

Dopo 36 ore la salamandra è vivace quasi come normalmente; il tumore dell'addome è diminuito, poichè l'animale ha emesso dell'acqua leggermente colorata. Aperta la cavità addominale ne fuoriesce del liquido poco colorato; gli organi, sciacquati rapidamente in soluzione di ClNa appaiono incolori, solo il peritoneo è leggermente tinto.

Al microscopio, gli elementi del sangue non hanno nessuna colorazione. La membrana peritoneale mostra dei gruppi di granuli di un rosso speciale, diverso da quello della fuxina. Nel fegato nessuna colorazione; nei reni alcuni canalicoli mostrano una tinzione abbastanza vivace nel citoplasma degli epiteli: i glomeruli sono invece perfettamente scolorati.

L'aggiunta di acido acetico all' 1 % nei suddetti preparati non ha prodotto alcuna colorazione.

Altre salamandre trattate nello stesso modo hanno vissuto 2 o 3 giorni e non hanno presentato fenomeni speciali.

b) In una goccia della suddetta soluzione si pone un po' di muccosa tolta dal palato di una rana. Gli epiteli vibratili non lesi hanno in principio un movimento celerissimo e non hanno assunto per niente colore: di quelli offesi dalla esportazione si colorano in principio i nuclei e i granuli che si osservano sotto la faccia che porta le ciglia; più tardi però anche questa lieve colorazione diminuisce. Dopo un'ora circa tutti gli epiteli son fermi e il preparato resta sempre incoloro, nè l'aggiunta di acido acetico vi produce alcuna alterazione.

c) I fiori di Iris, immersi in una soluzione di fuxina in acqua distillata, non mostrano, dopo due giorni, alcuna colorazione; si appassiscono però presto, prima di quelli mantenuti in acqua semplice. I fiori infranti e bagnati con acido acetico non si colorano. Raccolto un certo

numero di tepali perfettamente bianchi e messi a macerare nell'alcool assoluto, filtrato ed evaporato questo a consistenza sciropposa e aggiunta, dopo lieve acidificazione con acido acetico, un po' di aldeide etilica, si produsse una leggera, ma caratteristica colorazione rossa.

2. *Nitrato di Rosanilina.*

Le esperienze fatte con questa sostanza colorante han dato resultati presso a poco simili a quelli sopra descritti; soltanto è da notarsi la velenosità un po' maggiore di tale composto, perchè le salamandre iniettate con una soluzione simile alla precedente, dopo 36 ore apparvero come paralizzate e gli epiteli vibratili si fermavano prima che quelli messi nella soluzione di fuxina.

3. *Violetto di Genziana* (*Gentianaviolett*).

Miscela di cloridrati di pentametilpararosanilina e di esametilpararosanilina.

Se ne scioglie g 0·50 in 100 cc di soluzione di ClNa.

a) Iniezione nel peritoneo d'una salamandra in quantità di 2 cc.

Dopo 36 ore la salamandra ha un po' diminuita la reazione agli stimoli, ma è in buone condizioni. Aperta la cavità addominale si trova poco liquido colorato; i visceri hanno un aspetto violaceo, ma il colore imbeve solo lo strato più superficiale, poichè al taglio si presentano come normali; solo nei reni appare un colorito rossoviolaceo. Negli elementi del sangue nessuna colorazione. Nel peritoneo si riscontrano gruppi di granuli di intenso colore violetto, ed anche alcuni nuclei hanno tale aspetto; nei reni si ritrovano alcuni canalicoli con intensa colorazione. Nei muscoli nessuna colorazione.

b) Gli epiteli vibratili della rana, posti in una goccia della detta soluzione, conservano per parecchio tempo i loro novimenti; quelli però offesi dal taglio assumono una colorazione intensa assai per il nucleo e per i granuli che si riscontrano nella parte più esterna della cellula. Le cellule viventi sono da principio completamente bianche, poi comincia in loro una leggera colorazione dei granuli sopradetti e di altre grosse sfere refrangenti (vacuoli?) che si trovano nella parte profonda del citoplasma. Tale colorazione progredisce col diminuire dei movimenti, in modo che è facilmente apprezzabile la proporzione inversa che esiste fra questi due fenomeni; raggiunge poi tutto il citoplasma e finalmente il nucleo, allora la cellula è del tutto ferma.

Le cellule mucipare che esistono tra questi epiteli mostrano fin da principio, anche quando le ciglia a loro vicine son mobilissime, una colorazione dei granuli di cui è ripieno il loro protoplasma.

Poichè questa sostanza per la sua poca velenosità e per il forte potere colorante, si prestava bene a tali osservazioni, descriverò qui altre esperienze compiute anche con altri colori, ma che con questo e col bleu di metilene dettero i migliori resultati.

Alcuni preparati eseguiti nel modo suddetto, furono osservati al microscopio sul tavolo riscaldante a circolazione di acqua (Modello Reichert). Finchè la temperatura non oltrepassò i 20°, gli epiteli conservarono movimenti vivacissimi e si mantennero incolori; quando però la temp. raggiunse i 50° le cellule si fermarono, e quasi subito avvenne la colorazione, che questa volta incominciò dal nucleo. Resultati concordanti apparvero mescolando alla soluzione colorante del bisolfato di chinina o cloridrato di morfina. La morte e la contemporanea colorazione degli epiteli vibratili avvenne abbastanza rapidamente, in modo da permettere in un tempo breve l'osservazione di tutto il processo.

c) I fiori d'Iris non si colorano nei primi tempi finchè sono vivaci; la colorazione comincia ad apparire, nei grossi vasi dei tepali, con l'appassimento; e in questo caso al microscopio i nuclei si mostrano colorati.

4. Verde di Metile (Methylgrün).

Sale doppio di cloruro di zinco e di cloridrato di clorometilrosanilina.

Se ne scioglie g 0·70 in 100 di soluzione di Cl Na.

a) iniezione nel peritoneo d'una salamandra in quantità di 2 cc. La salamandra muore 4 ore dopo. Si apre immediatamente. Nella cavità peritoneale esiste gran parte del liquido colorato. I visceri hanno una colorazione verde soltanto superficiale; il peritoneo è verdognolo.

Al microscopio i corpuscoli del sangue si mostrano del tutto incolori; solo alcuni leucociti hanno l'aspetto descritto più sotto. Nel peritoneo si vedono molti nuclei colorati in bleu e dei gruppi di granuli d'un colore violaceo. Nei visceri niente di notevole.

Un'altra salamandra fu serbata altre 4 ore dopo la morte. Nell'addome si trova una discreta quantità di colore. I visceri appaiono intensamente verdi. Il sangue al microscopio mostra una intensa colorazione verde dei nuclei di una gran parte dei corpuscoli rossi; in questi si vedono inoltre nel citoplasma 3 o 4 granuli di differente grandezza e di color verde chiaro. Anche molti leucociti appaiono colorati, avendo

il nucleo un tono decisamente verde, il citoplasma una nuance violetta. Nei visceri si mostrano colorate le cellule degli strati superficiali, e in tutte queste la nuance verde del nucleo è evidente.

b) Gli epiteli vibratili muoiono presto nella soluzione di verde di metile e la loro colorazione avviene rapidamente. Questo colore ha grande affinità con i granuli della parte libera della cellule e col nucleo. In un primo momento i granuli si colorano in bleu e il citoplasma diffusamente in leggero violetto; poi (fermandosi le ciglia) si colora anche il nucleo, ma in verde. Le cellule lese dallo sfibramento si colorano completamente in verde. Le cellule mucipare mostrano fin dal principio della preparazione, quando ancora le ciglia degli elementi vicini si muovono, una decisa tinta verde.

c) I fiori d'Iris non assumono nessuna colorazione e si mantengono vivaci.

5. *Fuxina acida* (*Rubin S*).

Miscela di rosanilin- e di pararosanilinsolfonato di sodio.

Se ne scioglie g 0·75 in 100 di soluzione di Cl Na.

a) Iniezione nel peritoneo d'una salamandra in quantità di cc 2. La salamandra dopo 36 ore è in cattive condizioni, presso a morire. Aperta la cavità addominale ne esce del liquido pochissimo colorato. I visceri son colorati diffusamente negli strati superficiali; il peritoneo è pure rossastro. Al microscopio gli elementi del sangue non presentano alcuna colorazione; il peritoneo mostra alcuni nuclei rossi e una quantità di granuli color rossomattone con una nuance del tutto speciale. I diversi organi son pure incolori, eccetto che i reni, i quali mostrano alcuni canalicoli con epiteli ricchi di grossi granuli rossi; i glomeruli però sempre del tutto bianchi. Muscoli e nervi senza alcuna colorazione. L'acido acetico e il cloridrico allungati non recano variazioni nella colorazione dei preparati.

b) Gli epiteli vibratili posti in questa soluzione seguitano a muoversi per qualche tempo; quelli lesi dallo sfibramento si colorano subito intensamente e diffusamente; gli altri col diminuire della loro vitalità non mostrano la comparsa di colore, eccettochè assai tardi, apparisce una lieve tinta diffusa pel citoplasma. L'aggiunta di acido acetico molto allungato produce qualche volta una colorazione rosea negli epiteli morti e scolorati.

c) Nei fiori di Iris immersi in una soluzione in acqua distillata compare il colore dopo circa 15 minuti nei grossi vasi mediani dei tepali; il colore poi si diffonde per tutti i vasi, restando però limitato in essi,

dimodochè si vede come una rete che circonscrive delle aree bianche. Più tardi, il fiore cominciando ad appassire, si colorano diffusamente anche queste; ed osservando al microscopio le cellule di queste porzioni se ne vedono i nuclei tinti in rosa.

6. Verde lucente (Lichtgrün).

Tetrametil-diamido-trifenilcarbinolmonosolfonato di sodio.

Le esperienze fatte con una soluzione di g 0·75 in g 100 di soluzione di Cl Na han dato resultati quasi del tutto eguali a quelli sopra descritti.

II. Derivati del Fenolo.

7. Acido picrico (Pikrinsäure).

Trinitrofenolo simmetrico.

Se ne scioglie a saturazione in 100 cc di Cl Na.

a) Le salamandre iniettate con 1 cc di questa soluzione muoiono prestissimo (circa ½ ora dopo). I visceri appaiono del tutto gialli. Gli elementi del sangue non mostrano colorazione apprezzabile; i loro nuclei sono come contratti e più refrangenti del normale. Negli organi i vari elementi hanno una colorazione uniforme e diffusa nei vari strati, a seconda del tempo per cui ha durato l'azione del colorante.

b) Sugli epiteli l'azione venefica dell'acido picrico si manifesta subito con la rapida cessazione di movimenti delle ciglia, e con un rimpiccolimento del citoplasma e del nucleo. La colorazione comincia immediatamente dai margini cellulari ed invade presto anche il nucleo, progredendo in modo diffuso ed eguale: la cromatina resta per qualche tempo scolorata, poi assume anche essa un colorito giallo chiaro.

c) I fiori di Iris si appassiscono ben presto, mostrando nello stesso tempo una uniforme colorazione giallognola. Al microscopio le cellule mostrano la loro membrana raggrinzata, il succo e i granuli protoplasmatici appena colorati; i nuclei gialli dal tutto.

8. Auranzia (Aurantia).

Sale ammonico dell'exanitrodifenilammide.

Se ne sciolgono g 0,75 in 100 cc di soluzione di Cl Na.

I resultati delle esperienze fatte nel solito modo con questa sostanza sono stati simili ai precedenti. Però mostrano che la velenosità ne è minore; e maggiore il potere colorante. Da ciò delle piccole variazioni che hanno permesso di utilizzar meglio questo che il precedente composto.

9. Corallina (Corallin wasserlöslich).
Sale sodico dell'acido pararosolico.

Se ne scioglie 1 g in 100 cc di soluzione di Cl Na.

a) La salamandra iniettata con due cc di questa soluzione non mostra, dopo 48 ore, fenomeni di intossicazione. All'apertura dell'addome fuoriesce poco liquido appena colorato. I visceri hanno assunto una lieve tinta nello strato superficiale. All'esame microscopico, nè il sangue, nè gli altri tessuti mostrano elementi colorati, ad eccezione del peritoneo e dei reni, nei quali si ritrovano dei granuli e dei nuclei di colore arancione. L'esposizione all'aria non produce colorazione in pezzetti di organi rapidamente lavati con soluzione di Cl Na.

b) Gli epiteli vibratili, messi nella soluzione suddetta, conservano i loro movimenti per qualche tempo e restano scolorati anche dopo che le ciglia si sono fermate; solo assai tardi comincia una colorazione diffusa giallastra.

c) I fiori di Iris si mantengono freschi e mostrano una leggera colorazione soltanto nei grossi vasi mediani alla base dei tepali. L'estratto alcoolico dei tepali perfettamente bianchi, portato quasi a secco nel bagnomaria e riscaldato con poco acido arsenico dà una leggera colorazione gialla.

10. Eosina (Eosin wasserlöslich).
Sale sodico della tetraiodofluorescina.

Se ne sciolgono g 0·75 in 100 cc di soluzione di Cl Na.

a) La iniezione di 2 cc di questa soluzione nel peritoneo di una salamandra produce la morte dell'animale in 4—6 ore. All'apertura dell'addome fuoriesce il liquido come fu iniettato. Il peritoneo e i visceri hanno assunto una intensa colorazione. Al microscopio alcuni dei corpuscoli, specialmente dei bianchi, son diffusamente colorati in rosa; negli altri organi si riscontrano cellule tinte in totalità. Anche i muscoli dell'addome son colorati uniformemente e così pure quelli degli strati più interni del dorso. I nervi non mostrano colorazione.

b) L'azione venefica dell'eosina si manifesta chiaramente anche negli epiteli vibratili i quali vengono uccisi rapidamente e con varia rapidità colorati. Durante quel poco di tempo però, che si mantengono mobili, nessuna benchè piccola quantità di colore penetra in alcuna parte della cellula.

c) I fiori di Iris si tingono rapidamente. Il colore, prima limitato ai vasi, si diffonde poi anche per il parenchima dei tepali, i quali di-

vengono così uniformemente rosei. Delle loro cellule, osservate al microscopio, alcune mostrano una colorazione limitata al succo cellulare e ai granuli protoplasmatici, altre mostrano colorato anche il nucleo. L'eosina non è tanto venefica per queste cellule vegetali come per le animali, poichè i fiori così trattati restano discretamente freschi, anche dopo la loro completa colorazione.

III. Tiazine.

Bleu di metilene rettificato (Methylenblau rectif. nach Ehrlich), Cloridrato di tetrametiltionina.

Se ne sciolgono g 0·50 in 100 cc di soluzione di Cl Na.

Essendo questa sostanza colorante la più adatta per le colorazioni vitali, perchè non è venefica, perchè ha grande affinità con vari elementi protoplasmatici, e infine perchè difficilmente viene alterata dalle attività biochimiche degli organismi, così le esperienze da me fatte in questo caso furono più ampie e più particolareggiate che negli altri.

a) Iniezione di 2 cc della suddetta soluzione nel peritoneo di varie salamandre. Queste rimangono vivaci, nè mostrano fenomeni speciali. Dopo 36 ore si apre l'addome ad una di esse. Fuoriesce poco liquido colorato intensamente; gl'intestini appaiono azzurri, il fegato verde-scuro, il cuore ed i reni verderossastri. All'esame microscopico del sangue si vedono molti leucociti con nucleo colorato in verde e con granulazioni citoplasmatiche azzurre di diversa grandezza; moltissimi corpuscoli rossi, con nucleo del tutto incoloro mostrano, nel corpo cellulare, 3 o 4 granuli verdi. Nel peritoneo si scorgono alcuni grossi nuclei colorati in azzurro e molti gruppi di granuli di color verde i quali sono di uniforme grandezza, perfettamente rotondi e disposti in modo identico a quello dei granuli di pigmento. Il fegato contiene elementi sanguigni colorati in parte o in totalità, e che mostrano segni di degenerazione o di disgregazione: degli epiteli molti hanno il citoplasma ripieno di minutissimi corpuscoli verdi: la maggior parte delle gocciole di grasso ha una nuance verdastra del tutto speciale. Gli epiteli intestinali hanno colorato il cosidetto *opercolo* e qualche granulo nell'interno del corpo cellulare: le cellule caliciformi mostrano intensamente colorata la mucina, in forma di granuli o di grosse gocciole. Nel pancreas non si ritrova alcuna colorazione. Nel rene i glomeruli sono del tutto incolori: gli epiteli dei canalicoli son talvolta ripieni di grossi granuli intensamente azzurri. Nel testicolo molti spermatozoi hanno la testa colorata,

pur conservando movimenti vivaci. I fasci del connettivo lasso sono sempre imbevuti soltanto di liquido colorante, che abbandonano facendo passare una corrente di acqua sul preparato; le singole fibrille e i nuclei delle cellule fisse sono nel maggior numero dei casi incolore; soltanto alcune goccioline di grasso e qualche piccolo granulo d'ignota natura son colorati. I muscoli dell'addome mostrano la sostanza contrattile come per il normale; appaiono però in essa tinti in azzurro molti piccoli granuli di grandezza poco differente tra loro disposti, in serie tra le colonne dei dischi o radunati in ammucchiamenti conici ai poli dei nuclei muscolari. I grossi tronchi nervosi del plesso lombare appariscono al di fuori macroscopicamente di un azzurro intenso; un pezzetto d'uno di essi immerso rapidamente in una goccia di soluzione fisiologica e compresso con il coprioggetti mostra una colorazione completa del perinervio e della sostanza interfibrillare; la mielina invece e i cilindrassi sono del tutti scolorati: dopo un po' di tempo compare la colorazione bleu nei cilindrassi, cominciando questa nei luoghi ove il taglio o lo schiacciamento avevan prodotto qualche lesione. Descriverò in seguito altre osservazioni sulla colorazione degli elementi nervosi.

Altre salamandre sono state iniettate, oltre che con la soluzione colorante, anche con piccole quantità di morfina o di curare. L'esame microscopico fatto 5 o 6 ore dopo la morte, rivela una intensa colorazione diffusa per tutti gli organi compreso il sistema nervoso, e più spiccata nei nuclei.

Altre salamandre ancora furono, dopo l'iniezione di 1 cc di sostanza colorante, rimesse nell'acquario ed ivi lasciate per 8, 15, 21 giorni. Esse apparvero per due o tre giorni poco vivaci; poi, quando fu scomparso il turgore dell'addome, ritornarono come normali, pur mostrando sempre un colorito verde nelle macchie gialle dell'epidermide e nella muccosa boccale. I reperti macroscopici e microscopici furono poco differenti in questi vari casi; e mostrarono soltanto come, con l'andar del tempo la sostanza colorante venga localizzata in certi punti e specialmente negli organi destinati alla eliminazione, essendo le colorazioni circoscritte a singole parti di cellule. Descriverò solamente alcune osservazioni fatte sopra una salamandra uccisa 15 giorni dopo l'iniezione del colore.

Nel sangue preso dal cuore i corpuscoli rossi non mostrano nessun punto di colorazione; i leucociti invece contengono, in numero maggiore o minore, alcuni corpuscoli di un bleu assai scuro e di forma e grandezza molto irregolari: questi non sembrano essere granulazioni colorate del citoplasma, ma piuttosto residui di elementi cellulari colorati o anche precipitati delle sostanze iniettate inglobati per fagocitosi. Nella ca-

vità peritoneale si trova un po' di essudato con colorito verde-bleu, e questo è composto in massima parte di elementi del sangue che mostrano, insieme a una maggiore o minore colorazione, caratteri di grande deperimento. I corpuscoli rossi hanno il nucleo decisamente verde e il citoplasma irregolare, raggrinzato, in parte talvolta disgregato e ricco di granuli pure verdastri; dei corpuscoli bianchi alcuni hanno il nucleo bleu; altri son ricchissimi di granuli bleu o verdi di differente grandezza. Tra questi elementi si trovano reticolati di fibrina di un colorito bleu intenso. Lo stomaco e l'intestino son ripieni di muco verdognolo. Quasi tutte le cellule epiteliali hanno nucleo e citoplasma perfettamente bianchi, ma su quest'ultimo spiccano alcuni grossi granuli rotondi di un colore azzurro cupo. Tra le fibre liscie della tonaca muscolare si vedono alcune regolari serie di uniformi granuli bleu. Il fegato, che appare ad occhio nudo molto ingrossato e di colorito rosso-bleu, è straordinariamente ricco di elementi sanguigni colorati e in via di disfacimento: in ispecie sono notevoli alcuni nuclei di corpuscoli rossi, colorati in azzurro e del tutto spogliati di citoplasma: gli epiteli epatici son normali. Nella milza si riscontrano pure corpuscoli sanguigni con somiglianti caratteri, e inoltre alcune cellule assai grandi con il citoplasma ripieno di granuli azzurri di eguale grandezza e perfettamente rotondi; e queste credo di poter identificare con quegli elementi basofili già descritti dall'Ehrlich e dal Westphal col nome di *Mastzellen*. Nel rene si vedono in un modo particolarmente distinto i glomeruli, le anse dei quali vengono ben delimitate da un certo numero di corpuscoli sanguigni più o meno colorati, la cui tinta fa spiccare questi organi nel resto del tessuto incoloro. Tali corpuscoli, oltre che entro le anse vasali, si mostrano ad infiltrare anche lo stroma del glomerulo. Gli elementi della capsula del Bowmann e della primissima porzione del canalicolo urinifero non mostrano nessun punto colorato; al contrario si presentano in certe porzioni del labirinto molti epiteli ripieni di grossi granuli azzurri ad anche con qualche grosso nucleo colorato.

b) Altre esperienze per lo studio della colorazione del sistema nervoso mediante il bleu di metilene, sono state da me fatte su rane e lucertole, iniettando forti quantità di questa sostanza nel sacco linfatico delle prime e sotto la pelle del dorso nelle seconde. Dopo 24 o 48 ore i grossi tronchi nervosi apparvero ad occhio nudo di un colore azzurro intenso; al microscopio però si mostrò totalmente colorato solo il perinervio. La maggior parte dei cilindrassi si serbò affatto normale, solo alcuni di essi, in piccole proporzioni, presentarono una colorazione azzurra; ma questi possedevano anche alcuni caratteri degenerativi, come

nodosità e andamento contorto e presenza di gocciole refràngenti, ialine lungo alcuni tratti di queste fibrille: ciò che del resto concorda con lo stati di semiparesi in cui si trovano gli animali che hanno subito iniezioni di forti dosi di bleu di metilene. In una rana iniettata nel solito modo, recisi poi i grossi tronchi lombari al punto d'emergenza dalle vertebre, nella prima porzione di questi, dopo qualche tempo, potei vedere i cilindrassi intensamente colorati in azzurro, essendosi però serbata la mielina normale o appena verdognola.

Nei muscoli striati e nel cuore, osservati dopo un rapido sfibramento nella soluzione di Cl Na, non si mostrarono elementi nervosi colorati; però, dopo l'esposizione all'aria durante qualche minuto, comparvero nei muscoli volontari (specialmente in quelli della lucertola) bellissime terminazione nervose, simili in tutto a quelle che si possono osservare mediante la reazione con il cloruro d'oro; e nel cuore una complicata rete di sottili filetti azzurri con ingrossamenti nei luoghi d'intersezione, come appunto vide il Dogiel (l. c.). Gli elementi nervosi di questi tessuti si videro meglio dopo la trattazione dei preparati con picrato ammonico o con cloruro platinico; e così nel cuore furono messe in evidenza alcune bellissime cellule rotonde dei gangli intracardiaci. Queste avevano il citoplasma ripieno di granuli oscuri e un prolungamento pure colorato in verde cupo.

Le grosse cellule del ganglio di Gasser della rana non mostravano alcuna colorazione nè nel corpo cellulare, nè nel prolungamento se il ganglio era osservato subito dopo la esportazione. Se poi si faceva l'osservazione dopo aver messo il ganglio allo scoperto, pur lasciandolo in rapporto con l'animale ucciso, ed averlo esposto all'aria per qualche tempo, allora il nucleo e il corpo cellulare apparivano verdi ed il prolungamento azzurro.

c) Gli epiteli vibratili del palato di rana conservano nella detta soluzione i movimenti delle loro ciglia per molto tempo. Le cellule lese dal taglio si colorano subito e con speciale intensità nel nucleo: delle altre acquistano, anche nella maggiore loro vivacità, il colore solo i granuli citoplasmatici. I primi ad apparire azzurri sono i grossi granuli assai refrangenti che in numero di 4 o 5 stanno generalmente alla base delle cellule; più tardi acquista il colore anche l'ammasso dei granuli rotondi che si riscontrano sotto la superficie ciliata: quando poi i movimenti si van facendo più lenti, la colorazione si diffonde e al solito, dopo la cessazione di essi, diviene azzurro anche il nucleo.

Come ho già detto nelle esperienze per il violetto di genziana, in un simile preparato posto sopra il tavolo riscaldante si potè osservare

avvenire rapidamente la colorazione con l'inalzamento della temperatura a 45—50°, e così pure con l'aggiunta d'una soluzione venefica (cloridrato di morfina, bisolfato di chinina, idroclorato di cocaina).

d) I fiori d'Iris con il gambo immerso nella soluzione di bleu di metilene a diverse concentrazioni, non mostrarono alcuna colorazione dei tepali.

IV. Colori azoici.

12. Bruno di Bismarck (Bismarckbraun).

Cloridrato di m-fenilendiammina-disazo-m-fenilendiammina-m-fenilendiammina.

Le esperienze fatte con questa sostanza, sciolta nella proporzione di g 0·75 in cc 100 di Cl Na, presentano, tranne che per il sistema nervoso, resultati simili a quelli descritti per il bleu di metilene, ma in modo meno evidente. La poca tossicità di questo composto, il suo forte potere colorante e la sua stabilità lo rendono utile per simili osservazioni.

Derivati solfonici degli azocomposti.

Le esperienze eseguite con le seguenti sostanze coloranti hanno dato resultati quasi completamente eguali tra loro. Per questo li descriverò, onde omettere ripetizioni, tutte in una volta. I colori scelti rappresentano ognuno un tipo nei vari gruppi della grande famiglia degli azocomposti.

13. Tropeolina O (Methylorange). Dimetilammido-azo-benzosolfonato di sodio.

14. Vesuvina acida (Säurebraun). α-naftolbenzilsolfonato di sodio.

15. Crisoina (Chrysoïn). Diossi-azo-benzolsolfonato di sodio.

16. Orange G. Ossiazo-benzol-β-naftolsolfonato di sodio.

17. Scarlatto imperiale (Biebricher Scharlach). Amido-azo-benzol-azo-β-naftoldisolfonato di sodio.

18. Rosso Congo (Congoroth). Benzidin-disazo-naftion-naftionato di sodio.

19. Bleu d'Azo (Azoblau). Tolidindisazo-α-naftolmonosolfo-α-naftolmonosolfonato di sodio.

Le soluzioni di queste sostanze, fatte in proporzioni poco diverse tra loro (0·75—1 in 100 di soluzione di Cl Na), e iniettate nelle salamandre in quantità di 2 cc, produssero intossicazioni più o meno lente. Uccise le salamandre dopo 36, 48 ore, si trovò sempre liquido intensamente colorato nella cavità addominale; i visceri apparvero con

una tinta abbastanza accentuata negli strati superficiali. Al microscopio gli elementi del sangue non mostrarono alcuna colorazione; nel peritoneo si osservarono colorati alcuni nuclei, e in generale assai intensamente molti gruppi di granuli. Questi erano specialmente ben colorati dal rosso di Congo e con un tono più bruno di quello che realmente possegga la soluzione di tal colore. Nei diversi organi il colore appariva limitato del tutto agli spazi interstiziali, nei quali sembrava imbevesse il connettivo: in certi epiteli renali si trovarono dei granuli colorati dal rosso di Congo. Alcuni preparati mantenuti per qualche ora in camera umida, mostrarono una leggera colorazione diffusa di tutto il citoplasma in certi elementi. E'probabile che questi dopo la loro morte, avessero assunto la sostanza colorante esistente tra il connettivo interstiziale. Il tono di questa colorazione era in generale un po' diverso da quello che avevano le soluzioni o il connetivo interstiziale; nelle esperienze col rosso di Congo ad es. molti elementi si tinsero in giallo chiaro. È interessante il fatto che con il rosso di Congo si tingono in rossobruno i granuli di alcune cellule del pancreas, i quali granuli eran sempre restati scolorati nelle altre esperienze.

b) Tutte le sopra nominate sostanze non mostrano un'azione spiccatamente venefica sugli epiteli vibratili, i quali restano mobili per qualche tempo, e durante questo non assumono nessun colore. Appena cessato il movimento, incomincia la loro tinzione diffusamente per il citoplasma e per il nucleo, la cromatina del quale si colora da ultimo.

c) I fiori di Iris immersi nella soluzione di crisoina, rosso di Congo, e bleu d'azo, restarono, dopo 24 ore, perfettamente bianchi — quelli immersi nelle soluzioni di tropeolina, scarlatto, orange e vesuvina acida mostrarono una leggera colorazione dei vasi, e le loro cellule osservate al microscopio mostrarono una leggera e diffusa colorazione del protoplasma intorno al nucleo, essendo però questo del tutto incoloro.

V. Azine.

20 Rosso neutrale (Neutralroth rectif. nach Ehrlich).[1]

Cloridrato di dimetildiammidotolufenazina.

Se ne scioglie un grammo in 100 di soluzione di ClNa.

a) Le salamandre iniettate con 1 fino a 2 cc di questa soluzione restano in vita per molti giorni. In quelle uccise dopo 24 ore si trova

---

[1]) Questa sostanza colorante è stata assai di recente adoperata dall'Ehrlich per le colorazioni vitali; e con essa l'Ehrlich è riuscito a tingere i granuli di

poco liquido colorato nell'addome, i visceri di colorito rosso-bruno; in quelle uccise dopo 4 giorni il liquido colorante è del tutto scomparso dalla cavità peritoneale e gli organi dell'addome mostrano soltanto una leggera colorazione.

Il reperto microscopico fa rilevare presso a poco gli stessi fatti già descritti per altri colori di anilina basici e non venefici. Nelle varie cellule si presentano colorati intensamente i soliti granuli. Manca per altro ogni colorazione nei granuli delle fibre muscolari e negli elementi del glomerulo e del labirinto del rene. Anche gli elementi nervosi non mostrano alcuna tinzione, neppure dopo esposizione all'aria.

b) Gli epiteli vibratili della rana, posti nella detta soluzione, seguitano a moversi per molto tempo. La colorazione, assai intensa nelle cellule uccise per il dilaceramento, comincia nelle cellule viventi dopo poco tempo, localizzandosi nei granuli della parte coperta di ciglia. In questo caso in alcune cellule si può notare una leggera colorazione del nucleo, anche mentre le ciglia si muovono ancora debolmente. Il contenuto delle cellule mucipare si colora durante la vita del citoplasma, assumendo un tono rossovioletto.

21 Safranina (Safranin).

Cloruro di para-amidofenil-para-amidofenazonium e di para-amido-tolil-para-amidofenazonium.

Se ne scioglie a saturazione in soluzione di Cl Na.

a) La salamandra iniettata con 2 cc di questa soluzione è vissuta circa 36 ore. Negli organi non si trova alcuna colorazione; solo il peritoneo è imbevuto uniformemente di un liquido roseo.

b) Gli epiteli vibratili perdono ben presto i loro movimenti, colorandosi debolmente in rosa.

c) I fiori di Iris non assumono nessuna colorazione e presto si appassiscono.

22. Indulina acida (Indulin wasserlöslich).

Indulinsolfonato di sodio.

Se ne scioglie g 0·75 in 100 cc di soluzione di Cl Na.

Questa sostanza si comporta in modo simile a quello descritto sopra per diversi azocolori, e perciò non merita una descrizione a parte.

---

diverse cellule di girini posti a notare in soluzioni allungatissime. — La Casa Grübler di Lipsia la produce a tale scopo seguendo le indicazioni di rettificazione proposte dall'Ehrlich stesso.

Nei fiori d'Iris potei osservare un fenomeno speciale: la colorazione cioè dei sottili vasi del margine dei tepali, mentre i grossi canali mediani restarono del tutto incolori.

VI Derivati della Chinolina.

23. Cianina (Cyanin).

Composto iodurato di chinolina e γ-metilchinolina.

Se ne scioglie a saturazione nella soluzione di Cl Na.

a) Le salamandre iniettate con 2 cc di questa soluzione muoiono in 5 o 6 ore. I visceri appaiono appena colorati in azzurro. Al microscopio il peritoneo mostra alcuni nuclei tinti intensamente in azzurro e dei granuli di colore verdognolo; i globuli sanguigni che circolavano nei vasi di esso, mostrano pure nuclei e granuli colorati. Negli strati più superficiali dell'intestino si vedono cellule con nucleo azzurro, e così pure in qualche canalicolo renale.

b) La cianina mostra evidentemente la sua azione tossica anche sopra gli epiteli vibratili, i quali muoiono rapidamente. Durante il breve periodo della mobilità delle loro ciglia, non si può osservare nessuna colorazione: appena cessato il movimento, la colorazione comincia dal nucleo. I granuli si tingono soltanto più tardi e raramente. Il citoplasma resta quasi sempre incoloro.

c) I fiori d'Iris non presentano alcuna colorazione e si mantengono vivaci.

VII. Derivati dell'antracene.

24. Bleu d'alizarina S. (Alizarinblau wasserlöslich).

Composto della diossiantrachinonchinolina col bisolfito sodico.

Se ne scioglie un grammo in 100 cc di soluzione di Cl Na.

a) Le salamandre iniettate con 1 cc di questa soluzione muoiono dopo 2 o 3 ore. All'apertura dell'addome fuoriesce un liquido rossobruno. I visceri sono intensamente colorati alla superficie. I corpuscoli del sangue non mostrano alcuna colorazione, solo alcuni leucociti hanno il nucleo lievemente colorato in azzurro. Nel peritoneo si riscontrano moltissimi nuclei di colorito bleu scuro e alcuni gruppi di granuli di varia forma e dimensione colorati in rossobruno, mentre i granuli destinati a trasformarsi in pigmenti sono tinti in azzurro. Negli altri organi la colorazione è uniformemente diffusa per tutti gli elementi fin dove è potuto arrivare il colore, interessando tanto il nucleo che il citoplasma.

b) Gli epiteli vibratili posti nella suddetta soluzione si fermano prestissimo e si colorano diffusamente e in modo uniforme.

Con lo scopo di studiare le affinità delle diverse parti delle cellule e dei tessuti, allo stato vivente o nella loro maggiore freschezza, verso vari colori, ho iniettato in alcune salamandre piccole quantità di miscele di soluzioni coloranti. Ho sperimentato con un certo numero di miscele composte di colori acidi e basici, scegliendo specialmente quei colori che mi avevano mostrato una minima tossicità, unita ad un forte potere colorante ed a una discreta resistenza contro i poteri di decomposizione dell'organismo. Ottenni i migliori resultati con una miscela a parti eguali di soluzione di bleu di metilene all'uno per cento e di soluzione satura di crisoina.

Le salamandre iniettate con 2 cc di questo liquido vissero in buone condizioni per 4 o 5 giorni. Uccise a vari intervalli, mostrarono nella cavità addominale un precipitato bruno-scuro; i visceri pure apparivano di questo colore. Al microscopio i corpuscoli rossi del sangue avevano i soliti 3 o 4 granuli tinti dal bleu di metilene, e il nucleo o incoloro o pur esso colorato in verde. I leucociti avevano il nucleo e il citoplasma perfettamente bianchi, ma in quest'ultimo spiccavano grandemente molte granulazioni: alcune di esse erano del tutto azzurre ed avevano forma rotonda e uniforme grandezza, altre erano color rosso vivo e queste mostravano una forma un po'irregolare e una grandezza diversa. Nel peritoneo i gruppi di piccoli granuli, varie volte ricordati, si erano colorati colla crisoina, mentre alcuni voluminosi nuclei e certe grosse granulazioni avevano assunto il color azzurro.

Nel rene i glomeruli avevano in generale una leggera tinta rosea diffusa, e in questa spiccavano i nuclei verdi di alcuni globuli del sangue circolante nelle anse vascolari. Fu assai interessante il vedere molti epiteli dei canalicoli contorti esser ripieni di granulazioni rosse, mentre molti altri dei canalicoli retti erano pieni di granulazioni consimili, ma azzurre. Nell'intestino la maggior parte delle cellule caliciformi conteneva granuli o grosse goccie colorate dal bleu di metilene; gli epiteli cilindrici avevano invece molti granuli rossi nella loro regione basale. Nella milza si mostrarono molte grandi cellule ricche di granulazioni azzurre (Mastzellen?) ed altre, ad esse consimili, ricche di granuli rossi (cellule eosinofile?).

* * *

Da tutte queste esperienze risulta accertato una volta di più che le cellule nella pienezza della loro vitalità, immerse in una soluzione

colorante, o circondate da plasma contenente disciolto un colore, non assumono nella maggior parte dei casi alcuna tinzione, e solo talvolta mostrano una colorazione limitata nettamente ad alcune parti. Appena invece in queste cellule diminuisce la attività biologica, comincia subito il fatto della tinzione con tutte le modalità fisiche e chimiche che possono caratterizzarlo; e questo processo, procedendo lentamente in ragione della diminuzione della vitalità, si compie nel momento in cui la cellula muore.

Qualunque colorazione è nei primi momenti, un processo puramente fisico, consistente nella introduzione del liquido che porta disciolto il colorante, entro il corpo da colorarsi: solo dopo compiutosi questo fatto fisico, avvengono ulteriori fenomeni per i quali si ha la fissazione del colore. Ciò è stato ammesso anche da coloro che sostengono più energicamente la teoria chimica della tinzione come il KNECHT il GRIESBACH, il FOL. Nel caso di tessuti asciuttati o disidratati mediante l'alcool, e messi in una soluzione colorante acquosa, il fatto fisico sopra accennato consiste in una *imbibizione*, e violente correnti di liquido si spingono nei pori e negli interstizi privi d'acqua, del corpo da tingersi; e in questo caso la colorazione avviene inevitabilmente, salvo a diventare poi (fissandosi o non fissandosi il colore) una tinzione essenziale, o a scomparire del tutto nei liquidi di lavaggio. Ma nel caso di elementi viventi, i pori e gli interstizi del protoplasma sono ripieni di acqua, e allora la introduzione della soluzione colorante è dovuta ad un processo di *diffusione*.

È noto come le diffusioni di due soluzioni l'una nell'altra attraverso corpi porosi, siano grandemente modificate dalla struttura del corpo poroso e dalle proprietà fisiche e chimiche delle soluzioni diffondenti. Queste modificazioni divengono massime nel caso che il corpo poroso sia rappresentato da un insieme di elementi viventi: poichè in tal caso un fattore sconoscinto, la attività vitale, prende una parte principalissima nell'insieme del fenomeno; che può venire cosi straordinariamente favorito e del tutto ostacolato. I fenomeni di osmosi che si osservano sperimentalmente col mezzo di una membrana morta, non sono più gli stessi se si adopra, con adatte condizioni, una membrane viva e vitale; e le leggi fisiche potute formulare con la osservazione del primo caso appaiono infrante nella osservazione del secondo [1]. E'anzi a tale violazione di certe leggi fisiche per opera dell'attività delle membrane

---

[1]) Cfr. HEIDENHAIN, Physiologie der Absonderungsvorgänge (HERMANN'S Handbuch Bd. V, p. 11).

viventi, che si debbono riferire tante funzioni fisiologiche; ed al ristabilirsi di queste leggi fisiche per degenerazione o morte degli elementi anatomici, tanti fenomeni morbosi.

I singoli elementi anatomici posseggono appunto questa proprietà, di favorire cioè l'ingresso nel loro corpo di materiali destinati alla nutrizione o ad elaborazioni speciali, e di respingere quelle altre sostanze che una volta penetrate nel citoplasma produrrebbero effetti dannosi. Tale attività di difesa che la cellula esercita sopra di sè e che poteva logicamente essere ammessa a priori, ha ora una conferma sperimentale nelle colorazioni vitali. I colori adoperati nelle mie esperienze rappresentano in genere sostanze inutili per la cellule o deleterie; e le cellule fino a che sono viventi si difendono contro la penetrazione di queste sostanze, entro il loro corpo, combattendo contro le ragioni fisiche della diffusione. Cessata per una causa qualsiasi la vita, allora queste cellule soggiacciono completamente alle leggi fisiche, e le soluzioni coloranti si diffondono in esse.

Da ciò consegue che non esistono reazioni di colorazione vitale come voleva Ehrlich per il sistema nervoso periferico, ma che invece la colorazione completa di un elemento anatomico è il segno della morte di esso.

Le esperienze sulle colorazioni vitali hanno però dimostrato che sovente possono avvenire tinzioni parziali nella cellula. Son questi processi di colorazione sempre ben limitati ad alcune parti speciali del citoplasma, e mai (nelle condizioni normali) si mostrano nel nucleo. Io ho cercato appunto di determinare il significato biologico di questi elementi facilmente colorabili, e le condizioni necessarie perchè avvengano simili parziali colorazioni.

Ora si tende sempre più ad ammettere che la cellula non debba esser considerata come la più semplice unità biologica, ma invece come un organismo complesso, di cui i vari elementi abbiano diversa vitalità e funzionalità. Questo concetto che ha raggiunto adesso la sua più alta espressione con la teoria dei „Bioblasti“, di Altmann (51) è in un senso più o meno lato accettato da tutti.

Ora per quanto la energia vitale sia un elemento del tutto sconosciuto, pure possiamo presumere che essa non sia eguale per tutti gli elementi che compongono una cellula, ma maggiore per alcuni, minore per altri; e in secondo luogo che essa stia in rapporto con la attività funzionale e con l'importanza della funzione disbrigata, in modo che da queste ragioni si possa desumere il grado di energia vitale dei diversi

elementi. Anche la diversa resistenza delle varie parti cellulari contro agenti deleteri, conferma l'opinione suddetta.

Così per esempio il nucleo possiede funzioni molteplici e svariate e particolamente, come ora è ammesso da molti, un'azione direttiva e regolatrice su tutte le funzionalità cellulari. A lui è commessa la riproduzione cellulare e la trasmissione dei caratteri ereditari. Inoltre nei processi patologici di non grave intensità, mostra una resistenza assai maggiore che il citoplasma. Per tutto ciò è naturale ammettere che il nucleo abbia una energia vitale più grande che gli altri elementi cellulari.

Anche nel citoplasma stesso sono state descritte da tutti gli autori almeno due sostanze diverse, e attribuite a loro diversa funzionalità ed energia; come pure è stata dimostrata la presenza nel corpo cellulare di elementi speciali del tutto inerti.

Ammessa dunque una diversa energia vitale nelle varie parti della cellula e dato il caso di colorazioni parziali in essa, quali parti si tingeranno, quelle che posseggono la più alta energia, o quelle che la posseggono in minima proporzione o quelle che non ne hanno alcuna?

Anche a priori, per quello che ho detto sopra in riguardo alla tinzione delle cellule viventi o morte, si può pensare che i costituenti cellulari dotati della maggiore energia vitale respingano con la massima efficacia le sostanze coloranti, mentre ciò non possano fare quegli altri elementi nei quali tale energia è debole o nulla.

Il nucleo infatti che, come ho detto sopra, possiede la più alta attività biologica non si tinge mai durante la vita, per quanto le sostanze che lo compongono ed in ispecie la cromatina, abbiano una grande affinità verso i colori.

La parte elaboratrice del citoplasma, quella che è stata dagli autori chiamata con nomi diversi, ma alla quale si attribuì sempre la maggiore importanza biologica, vale a dire la *Filarmasse* di Flemming il *Netzwerk* di Frommann il *Wabengerüst* di Bütschli la *Intergranularsubstanz*[1] di Altmann non assumono durante la vita alcuna sostanza colorante. E neppure si colorano mai i dischi delle fibre muscolari striate finchè conservano la possibilità di contrarsi, nè le ciglia vibratili finchè sono mobili.

Da altra parte si colorano nelle cellule viventi, con l'uso di convenienti sostanze, alcuni elementi dei quali non è difficile riconoscere la natura.

---

[1]) A proposito della vitalità della sostanza intergranulare Altmann dice (l. c. 51): Dass die Intergranularsubstanz lebt, ist ebenso gewiss.

È necessario che io riassuma dalle esperienze sopra esposte cotali fatti e dia brevi descrizioni di questi elementi colorabili, come essi si presentano nelle cellule dei diversi tessuti. Nei corpuscoli rossi si ritrovano spesso colorati 3 o 4 piccoli granuli, che occupano posti differenti nel citoplasma. Nei corpuscoli normali simili granuli appaiono come goccioline jaline piuttosto refrangenti, incolore. La incostanza nel presentarsi, le differenze di grandezza e di ubicazione convincono subito che questi granuli non sono organi essenziali della cellula sanguigna. Probabilmente sono invece materiali nutritizi immagazzinati dal citoplasma o prodotti dal ricambio cellulare destinati ad essere espulsi. Nei leucociti si possono pure riscontrare granuli colorati in diverso numero e aspetto. La differenza di costituzione delle granulazioni leucocitarie rivelatasi dalle reazioni microchimiche usate dall'Ehrlich, è stata da me riscontrata con evidenza. Le iniezioni di miscele di colori mi hanno mostrato granuli differentemente colorati nello stesso leucocito vivente, e questa diversità di reazione microchimica indica una diversità di natura e di origine nei granuli stessi. Da osservazioni più accurate mi resultò che alcuni granuli, e specialmente quelli che si coloravano in rosso con la crisoina nell'esperienza 24ª, provenivano dal di fuori, e non erano altro che frammenti più o meno regolari di cellule disfatte, inglobate per fagocitosi: simili frammenti così colorati notavano liberamente in discreta quantità nel plasma sanguigno. Altre granulazioni basofile, colorate dal bleu di metilene, numerosissime in alcuni leucociti, rappresentavano invece secondo me alimenti immagazzinati nel citoplasma, come già fu pensato per le così dette *Mastzellen*. Infine altre granulazioni debbono essere come dice l'Ehrlich considerate come il *secreto di uno specifico scambio materiale della cellule.*

Nel peritoneo ho visto di frequente gruppi di granuli colorati di uniforme grandezza collocati fittamente uno vicino all'altro, in larghe striscie ramificate, con disposizione identica a quella dei granuli di pigmento. Con frequenza si poteva vedere che una ramificazione conteneva granuli di vero pigmento vicino al nucleo, granuli colorati verso lo periferia; dimodochè appariva chiaramente che questi granuli colorati eran destinati a trasformarsi in pigmento; o a meglio dire che rappresentevano un primo stadio della formazione pigmentaria. Ora è noto che i pigmenti di origine fisiologica rappresentano quasi sempre i residui del ricambio materiale del corpo della cellula e del nucleo[1], ed è giusto quindi considerarli fin

---

[1]) Toldt (52) dice: Was speciell das Vorkommen der Pigmentstoffe betrifft, so darf als sichergestellt betrachtet werden, dass viele derselben als Producte der Stoffwechsel an Ort und Stelle in dem Zellleib entstehen (p. 21).

nei primi momenti della loro formazione, quando cioè appaiono quali granuli colorati, come un *caput mortuum*. Negli epiteli ghiandolari appaiono sotto forma di granuli colorati i prodotti della elaborazione secretoria finchè son contenuti dal citoplasma. La natura di tali granuli è stata accertata da molti degli autori sopra riferiti, e da me pure specialmente per riguardo alle cellule mucipare intestinali ed al pancreas, nei quali elementi i prodotti granulari della secrezione (che nel primo caso si colorano specialmente col verde di metile, nel secondo col rosso di Congo) hanno un aspetto tanto caratteristico da non lasciar dubbio di sorta. Ma le seguenti esperienze certificano ancora la opinione suddetta.

Legai a due rane l'esofago e iniettai loro nello stomaco $^1/_2$ centimetro cubo di soluzione di bleu di metilene al 0·5%. Richiuso l'addome, instillai ad una di esse, in varie riprese e con la distanza di qualche ora, alcune goccie di una soluzione di pilocarpina. Aprii in seguito lo stomaco ad ambedue le rane, e trovai in quello della rana iniettata con la pilocarpina una grande quantità di muco intensamente colorato in bleu e un forte edema della mucosa, che pure appariva azzurra anche dopo un prolungato lavaggio in cloruro di sodio. Alla osservazione microscopica gli epiteli cilindrici mostravano molti granuli colorati nel loro citoplasma; e quasi tutte le cellule mucipare presentavano o un considerevole ammasso di granuli azzurri, od una grossa goccia di muco colorato; è facile ora persuadersi della trasformazione dei granuli nella goccia di mucina. Nello stomaco dell'altra rana trovai che tanto gli epiteli cilindrici quanto le cellule caliciformi, contenevano solo pochi granuli colorati. Resultati identici e in modo più rapido ottenni con la iniezione di verde di metile nello stomaco di rane che avevano precedentemente ricevuto alcune instillazioni di pilocarpina. Consimili esperienze praticai in salamandre iniettando loro nel peritoneo, prima una soluzione di bleu di metilene, poi qualche goccia di pilocarpina, e osservandone i reni. Trovai così molti epiteli renali ripieni di granuli intensamente colorati in azzurro, fitti tra loro, e grossi come mai non se ne vedevano nei preparati di confronto. Nei muscoli dorsali di salamandre che hanno ricevuto iniezioni intraperitoneali di certi colori, si riscontrano sovente piccoli granuli colorati, disposti in serie tra le colonne dei dischi o in piccoli ammassi alle estremità dei nuclei negli spazi sarcoplasmatici. Tali granuli che per l'Arnstein (l. c.) sono il resultato di una degenerazione grassa incipiente, e per lo lo Schultze (l. c.) gli *organismi elementari* che l'Altmann descrisse tra i Disdiaclasti, sono, secondo me, prodotti della attività della sostanza muscolare;

e ottenui la prova di ciò nella esperienza seguente. Sottoposi alcune salamandre, iniettate al solito con soluzione di bleu di metilene, durante qualche ora, all'azione di una corrente faradica lentamente interrotta, in modo da ottenere con forti e ripetute contrazioni un lavoro straordinario dei muscoli del dorso. L'osservazione microscopica mi fece riscontrare allora in questi muscoli un grande numero di granuli azzurri di grandi dimensioni; così da dimostrarmi il rapporto diretto che esiste tra il lavoro muscolare e la produzione di questi granuli, e quindi come essi assai probabilmente rappresentino il prodotto del consumo dei muscoli stessi.

Adunque riassumendo credo di poter asserire che le parti le quali, sotto certe date condizioni, si colorano nelle cellule viventi, son quelle che hanno una attività vitale minima o nulla, essendo rinchiuse nel citoplasma o come materiali di nutrizione immagazzinati o come prodotti della elaborazione e del ricambio del citoplasma e del nucleo.

E se è lecito generalizzare i resultati delle esperienze da me fatte, da tale conclusione può dedursi l'altra, che cioè la colorazione durante la vita del tessuto di una parte di una cellula è segno che tal parte non ha alcuna energia vitale. Quindi i granuli colorati con il bleu di metilene descritti da Schultze e da Mitrophanow non possono esser considerati come „Bioblasti".

Ma perchè avvengano le colorazioni parziali suddette è necessario che si verifichino altre condizioni.

Ho già detto che la cellula vivente cerca di difendersi contro la introduzione in lei di materiali inutili o nocivi. Questa energia di difesa, stimolata appunto dalla azione *irritante* dei liquidi nocivi, è maggiore quanto qiù grande è l'azione irritante del liquido, vale a dire quanto più il liquido stesso è tossico. Al contrario è minima contro quelle sostanze che non hanno proprietà venefiche; e a queste invece la cellula vivente permette l'ingresso e la localizzazione nelle parti di cui sopra ho parlato. Quando poi il liquido colorante da cui una cellula è circondata è fortemente venefico, allora questo vince assai presto la resistenza oppostagli dalla cellula e, uccidendola, giunge rapidamente a colorarla.

Questo infatti hanno dimostrato le mie esperienze, nelle quali la azione tossica di una sostanza colorante era resa palese dalla maggiore o minore rapidità con coi avveniva la morte delle salamandre o il fermarsi degli epiteli vibratili.

Così per es., il bleu di metilene e il violetto di genziana sono sostanze poco venefiche per la maggior parte delle cellule, tanto è vero che le salamandre possono vivere per parecchi giorni in buone condizioni con l'addome ripieno di soluzioni di questi colori, e gli epiteli vibratili

immersi in tali soluzioni seguitano a muoversi per molto tempo. In tal caso la colorazione avviene molto lentamente ed è, come sopra ho detto, circoscritta alle parti meno vitali. Usando colori uno po' più venefici, come sono molti degli azocomposti, non si ha per molto tempo alcuna colorazione in nessuna parte della cellula, e solo quando comincia l'intossicamento comincia pure la tinzione, e ambedue i fenomeni procedono di pari passo. Infine, sperimentando con colori assai venefici come l'acido picrico, il verde di metile, l'eosina, le salamandre muoiono prestissimo e prestissimo si fermano gli epiteli vibratili, mentre con altrettanta rapidità avviene la colorazione uniforme, diffusa, intensa, fino a dove è potuto penetrare il colore e a seconda del potere tintorio di esso. Lo stesso avviene quando alla soluzione di un colore non tossico si aggiungono discrete quantità di un veleno come la chinina e la cocaina.

Un'altra condizione necessaria perchè avvenga la colorazione di una parte di una cellula vivente mediante un dato colore, è che questa parte abbia una *elettività* verso quel dato colore; vale a dire che per la sua natura chimica e struttura molecolare, causi e favorisca il saldamento delle molecole coloranti nella propria compagine, e si abbia così una tinzione *sostantiva*.

Poichè invero il fenomeno della elettività si può osservare anche nei semplici metodi di colorazione sulle cellule viventi o appena morte, da me praticati; ed è anzi degno di nota il vedere come alcune reazioni in questi casi riscontrate, siano le stesse che quelle osservate dopo le fissazioni e i trattamenti con mordenti come si usa nella tecnica istologica: così p. es. ho riscontrato che anche nelle colorazioni vitali la maggiore affinità verso le aniline basiche era propria della cromatina.

Però la elezione verso i differenti colori è permessa soltanto quando la energia vitale nelle varie parti della cellula è attutita o scomparsa. Così il nucleo le cui sostanze componenti han grande affinità per i colori basici, non si colora, non ostante questa affinità, che dopo la morte: ma appena morto si tinge con essi immediatamente e intensamente. Al contrario alcuni colori acidi (acido picrico, colori azoici) son preferiti dal citoplasma; mentre la cromatina almeno nei primi momenti, prima cioè che subentrino ulteriori trasformazioni fisiche e chimiche, non li assume.

La sostanza nervosa conducente mostra pure una grande e speciale elezione verso il bleu di metilene, ma questa elezione può manifestarsi solo appena è cessata la vitalità dei cilindrassi.

Da altra parte la affinità dei granuli di mucina per alcuni derivati basici della rosanilina, può, in causa della mancanza di energia vitale

in questi granuli, esplicarsi anche durante la vita della cellula caliciforme. Nel pancreas i granuli della secrezione possono *intra vitam* colorarsi solo con alcuni colori azoici (rosso di Congo). Infine le differenti colorazio ni ottenute mediante miscele, hanno dimostrato all'evidenza che la elettività ha luogo anche nelle cellule viventi.

Una terza condizione necessaria perchè avvengano colorazioni vitali è che il colore adoperato resista contro i poteri trasformativi delle cellule viventi.

Poichè realmente in molti casi la mancanza di ogni colorazione non si può attribuire che a decomposizioni più o meno profonde delle molecole coloranti: specialmente per i sali semplici della rosanilina, per i quali basta una reazione alcalina per annullare qualunque colorazione. Mosso (l. c.) ha dimostrato che è in causa di una reazione alcalina che il colore del verde di metile passa al violetto, e se tale alcalinità fa solo cambiar di nuance questo composto che è abbastanza resistente, può invece scindere i sali semplici della rosanilina, e la cellula imbevuta della base rosanilinica libera apparir scolorata. Qualche volta basta infatti l'aggiunta di un po' di acido acetico per veder di nuovo comparire il colore in una cellula trattata così.

Ma altre volte l'acidificazione non fa comparire alcun colore, ed allora è segno che si son prodotte modificazioni più profonde nella molecola colorante, e queste sono probabilmente *riduzioni*[1].

Già Heidenhain (l. c.), Wittich (l. c.), Ehrlich (l. c.) dimostrarono il potere riducente di certe parti dell'organismo, e come questo potere riducente si esercitasse in modo manifesto sui colori dell'indaco iniettati a scopo di ricerca fisiologica. Altri, senza dimostrarlo direttamente, hanno parlato di riduzione del bleu di metilene nelle colorazioni vitali. Io pure credo di dovere ascrivere a fenomeni di riduzione la scomparsa del colore dalle soluzioni di composti iniettati nell'addome delle salamandre, e la mancata colorazione dei fiori di Iris immersi nelle soluzioni suddette, poichè talvolta la semplice esposizione all'aria, talvolta l'uso di un ossidante sugli estratti alcoolici dei fiori faceva ricomparire il colore.

---

[1]) Molte delle sostanze coloranti artificiali sono suscettibili di riduzione per l'aggiunta di 2 H, cambiandosi così in leuco-composti. Ciò si ottiene chimicamente per mezzo di polvere di zinco e Cl H o col solfuro ammonico. La riossidazione e la contemporanea ricomparsa del colore può avvenire semplicemente per mezzo dell'ossigeno dell'aria, o si produce con il riscaldamento in soluzione alcoolica insieme a cloranile o con soluzione concentrata di acido arsenico.

Tutto ciò spiega come mai i derivati più semplici della rosanilina, per quanto non siano venefici ed abbiano un forte potere colorante, non riescano di solito a colorare nessuna parte delle cellule viventi.

Dalle esperienze e considerazioni suddette si può concludere che:

1°. Le cellule viventi non si colorano mai totalmente, poichè per la energia vitale che posseggono impediscono la diffusione delle soluzioni coloranti nell'interno del loro protoplasma.

2°. Verificandosi certe condizioni si possono colorare nelle cellule vive alcuni elementi, e precisamente quelli che non prendono alcuna parte attiva nella funzionalità cellulare, essendo rinchiusi nel citoplasma come sostanze nutritive immagazzinate, o come prodotti di una elaborazione secretoria e destinati ad essere espulsi.

3°. Non possono ammettersi dunque *reazioni coloranti vitali* nè nel senso di Ehrlich per il sistema nervoso, nè nel senso di Schultze e Mitrophanow per i granuli citoplasmatici: anzi la colorazione totale di un elemento anatomico è segno dell'avvenuta morte di esso. Le colorazioni parziali di una cellula vivente ci indicano che le parti colorate non posseggono alcuna attività.

4°. Le condizioni che è necessario che si verifichino perchè avvengano colorazioni parziali sono le seguenti:

a) Che la sostanza colorante adoperata non abbia alcuna azione tossica sui protoplasmi cellulari.

b) Che gli elementi che si vogliono colorare abbiano *elettività* per la sostanza colorante usata.

c) Che questa sostanza sia molto stabile e resista contro i poteri trasformativi (riduttivi) delle cellule viventi.

Bibliografia.

1. Heckel, E., Phénomène de localisation dans les tissus animaux (Journ. de l'Anat. et de la Physiol., 1875, p. 582).
2. Lieberkühn, Ueber die Einwirkung von Alizarin auf die Gewebe des lebenden Körpers (Marburger Sitzungsber., 1874, p. 33. Da Gierke, Zeitschr. f. wiss. Mikrosk. Bd. I, 1884, p. 87).
3. Heidenhain, Mikroskopische Beiträge zur Anatomie und Physiologie der Nieren (Arch. f. mikrosk. Anat. Bd. X, 1875, p. 1).
4. Chrzonszczewsky, Zur Anatomie und Physiologie der Leber (Virchow's Arch. Bd. XXXV, p. 153).
5. Wittich, Physiologie der Nieren (Arch. f. mikrosk. Anat. 1875 p. 75).
6. Schindler, Beiträge zur Kenntniss der Malpighi'schen Gefässe der Insecten (Zeitschr. f. wiss. Zool. Bd. XXX, 1878, p. 587).

7. Solger, Zur Physiologie der sogenannten Venenanhänge der Cephalopoden (Zool. Anz. Bd. IV, 1881, No. 88).
8. Ehrlich, Das Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus. Berlin 1885.
9. Kowalewsky, Ein Beitrag zur Kenntniss der Excretionsorgane (Biol. Centralbl. Bd. IX, 1889, p. 33, 65, 127).
10. Ehrlich, Ueber die Methylenblaureaction der lebenden Nervensubstanz (Deutsche med. Wochenschr. 1886, No. 4, 28. Jan.).
11. Ehrlich, Zur biologischen Verwerthung des Methylenblau (Biol. Centralbl. Bd. VII, 1886, p. 214).
12. Aronson, Inaugural-Dissertation. Berlin 1886. Da Feist (v. s.).
13. Arnstein, Die Methylenblaufärbung als histologische Methode (Anat. Anz. Bd. II, 1887, p. 125 u. 551).
14. Arnstein, Ueber die Nerven der Schweissdrüsen (Anat. Anz. Bd. IV, 1889, p. 378).
15. Smirnow, Die Structur der Nervenzellen im Sympathicus der Amphibien (Arch. f. mikrosk. Anat. Bd. XXXV p. 407) u. Ueber die Nervenendknäuel in der Froschlunge (Anat. Anz. Bd. III, 1888, p. 258).
16. Mayer, S., Die Methode der Methylenblaufärbung (Zeitschr. f. wissensch. Mikrosk. Bd. VI, 1887, p. 422).
17. Dogiel, Methylenblautinction der mothorischen Nervenendigungen in den Muskeln der Amphibien und Reptilien (Arch. f. mikrosk. Anat. Bd. XXXIII p. 305).
18. Dogiel, Die Nerven der Cornea des Menschen (Anat. Anz. Bd. V, 1890, p. 483).
19. Dogiel, Ein Beitrag zur Farbenfixirung von mit Methylenblau tingirten Präparaten (Zeitschr. f. wissensch. Mikrosk. Bd. VIII, 1890, p. 15).
20. Dogiel, Eine neue Imprägnationsmethode der Gewebe mittels Methylenblau (Arch. f. mikrosk. Anat. Bd. XXXIII p. 440).
21. Riese, Die feinsten Nervenfasern und ihre Endigungen im Ovarium der Säugethiere und des Menschen (Anat. Anz. Bd. VI, 1891, p. 401).
22. Feist, Die vitale Methylenblaufärbung des Nervengewebes (Arch. f. Anat. und Entwicklungsgesch. 1891, p. 116).
23. Prus, Ueber neuentdeckte Nervchen in der Scheide der Nerverstämme (Przgląd Lekarsky no. 30—33. Da Virchow's Jahresbericht 1886, I, p. 62).
24. Cuccati, Delle terminazioni nervee nei muscoli addominali della Rana temporaria e della Rana esculenta (Internat. Monatsschr. f. Anat u. Physiol. 1888).
25. Joseph, Die vitale Methylenblau-Nervenfärbungs-Methode bei Heteropoden (Anat. Anz. Bd. III, 1888, p. 420).
26. Retius, Ueber die Endigungsweise der Nerven in den Genitalnervenkörperchen des Kaninchens (Internat. Monatsschr. f. Anat. u. Physiol. Bd. VII, H. 8).
27. Ciaccio, Sur les plaques nerveuses finales dans les tendons des vertèbres (Arch. Ital. d. Biol. t. XIV, 1890, fasc. 1—2).
28. Zoja, R., Die vitale Methylenblaufärbung bei Hydra (Zool. Anz. Bd. XV, 1892, p. 241).
29. Apáthy, Erfahrungen in der Behandlung des Nervensystems für hystologische Zwecke (Zeitschr. f. wiss. Mikrosk. Bd. IX, 1892, p. 15).

30. Gerlach, Ueber die Einwirkung von Farbstoff auf lebende Gewebe (Wissenschaftl. Mitth. d. phys.-med. Soc. Erlangen 1858, H. I. Da Gierke, Zeitschr. f. wissensch. Mikrosk. Bd. I, 1884, p. 83).
31. Pouchet et Legoff, Mémoires de la Soc. de Biol. Décembre 1875.
32. Certes, Sur un procédé de coloration des infusoires et des éléments anatomiques, pendant la vie (Zool. Anz. Bd. IV, 1881, p. 209).
33. Certes, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1881, V. 92, p. 424.
34. Brandt, Färbung lebender einzelliger Organismen (Biol. Centralbl. Bd. I, 1881, No. 7).
35. Pfeffer, Ueber Aufnahme von Anilinfarben in lebenden Zellen. Ein Beitrag zur Mechanik des Stoffaustausches (Unters. a. d. Bot. Inst. Tübingen; Zeitschr. f. wissensch. Mikrosk. Bd. III, 1886, p. 542).
36. Flesch, Bemerkungen zur Kritik der Tinctionspräparate (Zeitschr. f. wissensch. Mikrosk. Bd. II, 1885, p. 464).
37. Schultze, Die vitale Methylenblaureaction der Zellgranula (Anat. Anz. Bd. II, 1887, p. 684).
38. Mitrophanow, Ueber Zellgranulationen (Biol. Centralbl. Bd. IX, 1889, No. 17 p. 541).
39. Martinotti, Sopra l'assorbimento dei colori d'anilina per parte delle cellule animali viventi (Zeitschr. f. wissensch. Mikrosk. Bd. V, 1888, p. 305).
40. Mosso, Anwendung des Methylgrün zur Erkennung der chemischen Reaction und des Todes der Zellen (Virchow's Arch. Bd. CXIII).
41. Grandis, Modifications des épithéliums glandulaires durant la sécretion (Arch. Ital. de Biol. t. XIV, 1890).
42. Pilliet, Coloration des tissus à l'état vivant (Journ. de Microgr. t. XII, p. 285).
43. Talat, Recherches sur la coloration des tissus chez les animaux vivants au point de vue histologique, Thèse, Paris 1886. (Da Pilliet.)
44. Kowalewsky, Ueber das Verhalten der morphologischen Bestandtheile der Lymphe und des Blutes zu Methylenblau (Anat. Anz. Bd. III, 1888, p. 53).
45. Kühn, Notiz über vitale Reaction der Zellgranula nach subcutaner Methylenblauinjection (Arch. f. Anat. u. Entwicklungsgesch. 1890, p. 113).
46. Cuénot, Etudes physiologiques sur les crustacés décapodes (Arch. de Biol. t. XIII fasc. 2).
47. v. Chochenhausen, Farbstoffe und Färberei (Muspratt's theoretische, praktische und analytische Chemie. Bd. III).
48. v. Meyer, Anilin- und sonstige Theerfarbstoffe. (Ibid. Bd. I.)
49. Schultz und Julius, Tabellarische Uebersicht der künstlichen organischen Farbstoffe. 1888.
50. Ehrlich, Berliner klinische Wochenschrift 1894, No. 21.
51. Altmann, Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen. Leipzig (Veit & Co.) 1894.
52. Toldt, Lehrbuch der Gewebelehre. Stuttgart 1888.

[Eingegangen am 22. Juni 1894.]